Prometheus Protokolü – Uygulama Reçetesi (v3.1 – Uygulama Sürümü)

1. Amaç ve Kapsam

Bu reçete, NMN + Torin 1 kombinasyonunun, $A\beta_{1-42}$ oligomerleri ile oluşturulan mitokondriyal ve lizozomal disfonksiyon modelinde, TFEB aracılı otofaji-lizozom yolağı üzerinden gösterdiği sinerjik etkiyi doğrulamak için kullanılır.

Reçete aynı zamanda, üçüncü bir moleküler yardımcı (cAMP artırıcı veya RAVE kompleksi mimetiği) eklenerek lizozomal asidifikasyonun tamamlanmasını ve üçlü sinerjinin (CI < 0.20) kanıtlanmasını hedefler.

Tüm basamaklar, patent öncesi kamuya açıklama (prior art) niteliğinde olup, ticari kullanım Creative Commons Atıf-GayriTicari-AynıLisanslaPaylaş 4.0 Uluslararası kısıtlanmıştır.

---

2. Hücre Kültürü ve Aβ Oligomer Hazırlığı

2.1. $A\beta_{1-42}$ Oligomerizasyonu (Her Yeni Batch İçin Zorunlu)

1. Liyofilize $A\beta_{1-42}$ peptidini HFIP içinde 1 mg/mL olarak çöz.

2. Oda sıcaklığında 1 saat beklet, ardından azot gazı altında HFIP'i uzaklaştır.

3. Peptid filmini DMSO ile 5 mM'da çöz, ardından fenolsüz DMEM ile 100 µM'a seyrelt.

4. 4°C'de 24 saat inkübe et (oligomerizasyon).

5. Her yeni batch için doğrulama:

· Western Blot (non-redükte): Trimer, tetramer bantlarını kontrol et.

· veya TEM ile oligomer yapısını görüntüle.

6. Kullanıma kadar -80°C'de sakla. Tek donma-çözme döngüsü.

2.2. Hücre Kültürü Koşulları

· Hücre hattı: Nöronal kaynaklı (SH-SY5Y veya primer kortikal nöronlar).

· Aβ oligomer uygulaması: 5–10 μM, 24 saat.

· Tedavi grupları:

  · Kontrol (taşıyıcı)

  · Aβ oligomer (hastalık modeli)

  · Aβ + NMN (tek)

  · Aβ + Torin 1 (tek)

  · Aβ + NMN + Torin 1 (ikili kombinasyon)

  · Aβ + NMN + Torin 1 + Asidifikasyon Stabilizatörü (üçlü kombinasyon)

---

3. Seahorse XF – Mitokondriyal Enerji Profillemesi

3.1. Hazırlık

· Hücreleri XF96 plakada 15.000–20.000 hücre/kuyu olarak ek.

· Tedavileri 24 saat uygula.

· Ölçüm günü: Mito Stress Test Kit (Agilent) kullan.

3.2. Ölçüm Parametreleri

Sırasıyla aşağıdaki enjektörleri kullan:

1. Oligomycin (ATP üretimi)

2. FCCP (maksimum solunum kapasitesi)

3. Rotenone + Antimycin A (non-mitokondriyal solunum)

Okunacak değerler:

· Bazal solunum

· ATP bağlantılı solunum

· Maksimum solunum kapasitesi

· ECAR (glikolitik kapasite)

3.3. Beklenen Sonuç

· NMN + Torin 1 grubu: Aβ'ya kıyasla OCR'de anlamlı artış.

· Üçlü kombinasyon: Tek başına ikili kombinasyona göre daha yüksek maksimum solunum kapasitesi.

---

4. TFEB Aktivasyonunun Katmanlı Doğrulanması

4.1. Nükleer Lokalizasyon (İmmünofloresan)

1. Hücreleri %4 PFA ile fikse et.
2. Birincil antikor: anti-TFEB (gece boyu, 4°C).
3. İkincil antikor: Alexa Fluor 488.
4. DAPI ile nükleus boyama.
5. Konfokal mikroskop ile görüntüle.
6. Analiz: TFEB'in nükleus/sitoplazma oranını ImageJ ile hesapla.

4.2. CLEAR Network Gen Ekspresyonu (qPCR)

1. RNA izolasyonu (TRIzol veya kit).
2. cDNA sentezi.
3. qPCR ile aşağıdaki genlerin ekspresyonunu ölç:
   · LAMP1
   · MCOLN1
   · v-ATPase alt birimleri (ATP6V1A, ATP6V0C gibi)
4. Normalizasyon: GAPDH veya ACTB.

---

5. Lizozomal Asidifikasyonun Doğrulanması (Üçlü Kombinasyon İçin)

5.1. LysoSensor Canlı Hücre Boyaması

1. LysoSensor Yellow/Blue DND-160 veya LysoTracker Deep Red kullan.
2. Hücrelere 30 dakika önce boya ekle.
3. Canlı hücre görüntüleme (konfokal veya floresan plat okuyucu).
4. pH kalibrasyonu için nigerisin + monensin ile standart eğri oluştur.
5. Hedef: Tedavi grubunda lizozomal pH'ın 4.5–5.0 aralığına düştüğünü göstermek.

5.2. Native-PAGE ile v-ATPase Kompleks Montajı

1. Hücre lizatlarını native (non-denature) lizis tamponu ile hazırla.
2. Native-PAGE yürüt.
3. Western Blot ile v-ATPase V1 alt birimi (ATP6V1A) ve V0 alt birimi (ATP6V0C) probu yap.
4. Beklenen: Kombinasyon grubunda yüksek molekül ağırlıklı (birleşmiş) kompleks bantlarının artışı.

---

6. Sinerji Analizi (Chou-Talalay)

6.1. Doz-Yanıt Eğrileri

· NMN ve Torin 1'i tek başlarına 6–8 farklı konsantrasyonda test et.
· Her madde için IC_{50} (Aβ kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonda ATP üretimini %50 restore eden doz) belirle.

6.2. Kombinasyon İndeksi (CI)

Formül:

```
CI = (D)₁ / (Dx)₁ + (D)₂ / (Dx)₂
```

```

· $(D)_1$, $(D)_2$: Kombinasyonda kullanılan dozlar

· $(Dx)_1$, $(Dx)_2$: Aynı etkiyi tek başlarına sağlayan dozlar

Yorum:

· CI < 1: Sinerji

· CI = 1: Aditif

· CI > 1: Antagonizma

Üçlü kombinasyon için formül genişletilir:

```

$$CI = (D)_1 / (Dx)_1 + (D)_2 / (Dx)_2 + (D)_3 / (Dx)_3$$

```

Hedef: İkili kombinasyonda CI < 1, üçlü kombinasyonda CI < 0.20.

---

7. İstatistiksel Güç ve Veri Şeffaflığı

7.1. Tekrar Sayıları

· Biyolojik tekrar (N): 4–5 bağımsız deney

· Teknik tekrar (n): Her deneyde 3 well / grup

7.2. Ön Kayıt ve Veri Paylaşımı

· Deney tasarımı, OSF (Open Science Framework) üzerinde ön kayıt yapılacak.
```

· Ham veriler (blot görüntüleri, mikroskopi meta verileri, Seahorse dosyaları) yayın sırasında açık erişim sunulacak.

---

8. Hukuki ve Lisans Notu

Bu reçete, Mart 2026 itibarıyla kamuya ifşa edilmiş prior art niteliğindedir.

İçerdiği:

· tüm madde kombinasyonları (NMN + Torin 1 ve üçüncü moleküller dahil),

· tüm ölçüm yöntemleri (Seahorse, TFEB lokalizasyonu, CLEAR panel, LysoSensor, Native-PAGE),

· tüm sinerji aralıkları (CI < 1 ve CI < 0.20 dahil)

üzerinde üçüncü şahıslar tarafından patent alınamaz.

Bu lisans, eserin ticari olmayan amaçlarla paylaşılmasına, kopyalanmasına, dağıtılmasına ve türetilmesine izin verir. Tüm kullanımlarda Muzaffer Enes Yünlü'ye atıf yapılması zorunludur. Türetilen çalışmalar aynı lisansla paylaşılmalıdır. Ticari kullanım için hak sahibinden ayrıca yazılı izin alınması gerekir.Creative Commons Atıf-GayriTicari-AynıLisanslaPaylaş 4.0 Uluslararası